DOI 10.22092/VJ.2018.116620.1403
شماره ۱۱۹ تابستان ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

شناسایی پروتئین‌های راپتری۴ (ROP۴) و انولاز۲ توکسوپلاسما گوندی به عنوان آنتی ژن‌های غالب ایمنی در گوسفند

• محمدتقی احدی
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
• رسول مدنی(نویسنده مسئول)
بخش پروتئومیکس و بیوشیمی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.
گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران.
• ناصر حقوقی راد
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
• احمدرضا اسماعیلی رستاقی
بخش انگل شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۲۶-۰۹-۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۰۹-۱۱-۱۳۹۶
Email: madanirasool@gmail.com

چکیده

توکسوپلاسما گوندی *(Toxoplasma gondii)*، تک یاخته مهم و پاتوژن اجباری درون سلولی است که در میزبانان واسط (مهره‌داران خونگرم) ایجاد عفونت توکسوپلاسموزیس حاد و مزمن می‌نماید. توکسوپلاسموز مادرزادی در انسان و گوسفند در دوران بارداری منجر به سقط جنین می‌شود. به منظور تهیه داروهای شیمیایی و تولید واکسن موثر علیه عفونت توکسوپلاسموز و همچنین تهیه مارکرهای تشخیصی قوی و مناسب برای استفاده در تکنیک‌های سرولوژیکی، مولکولی، شناسایی پروتئین‌های تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندی اهمیت زیادی دارد. هدف از انجام این تحقیق، شناسایی و معرفی پروتئین‌های آنتی‌ژنیک و ایمونوژنیک غالب ایمنی توکسوپلاسما گوندیی در گوسفند با استفاده از تکنیک ایمونوپروتئومیکس بود. برای تهیه تاکی زوئیت‌ها، تعداد ۳۰ سر موش سوری (C57BL/6) ماده بالغ ۷-۵ هفته به انگل توکسوپلاسما گوندی آلوده شدند. پروتئین‌های تاکی‌زوئیت‌ها با روش سونیکاسیون استخراج گردید. غلظت پروتئین‌ها به روش بردفورد تعیین شد. از ۱۰ راس گوسفند آلوده به توکسوپلاسما گوندی، سرم حاوی آنتی‌بادی ضد توکسوپلاسما تهیه گردید. مراحل الکتروفورز دوبعدی 2-DE-SDS-PAGE، وسترن بلاتینگ و ایمنوبلاتینگ اجرا شد. با انطباق دادن تصاویر ژل‌های 2-DE و ایمنوبلاتینگ، اسپات‌های مربوط به پروتئین‌های آنتی‌ژنیک و ایمنوژنیک غالب ایمنی شناسایی و مورد برش و با روش‌های مس اسپکترومتری MS/MS و MALDI-TOF/MS مورد آنالیز قرار گرفت و پروتئین‌های انولاز ۲ و پروتئین راپتری ۴ (ROP۴) شناسایی شد. این دو پروتئین می‌توانند به عنوان مارکرهای تشخیصی در تکنیک‌های سرولوژیکی مانند الایزا و نیز در تولید واکسن علیه عفونت توکسوپلاسموز مورد استفاده قرار بگیرند.

کلمات کلیدی: توکسوپلاسما گوندی، پروتئین راپتری۴، انولاز۲، آنتی‌ژن غالب ایمنی، گوسفند، ایمونوپروتئومیکس

Veterinary Researches & Biological Products No 119 pp: 99-107

Identification of *Toxoplasma gondii* ROP4 and Enolase2 Proteins as Immunodominant Antigens in Sheep

By: Ahady, M.T., Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Madani, R., (Corresponding Author) Proteomics and Biochemistry Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Department of Microbiology, School of Specialized Veterinary Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Hoghooghi-Rad, N., Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. and Esmaeili Rastaghi, A.R., Department of Parasitology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Received: 2017-12-17 **Accepted:** 2018-01-29

Toxoplasma gondii is an important intracellular and obligatory protozoan that causes acute and chronic toxoplasmosis in warm-blooded hosts including sheep and humans. This infection can lead to stillbirth among pregnant women and ewes. Identification and detection of *Toxoplasma gondii* tachyzoites proteins especially antigenic and immunogenic proteins is crucial and essential for producing efficacious and potent drugs and vaccines against toxoplasmosis, and also for introducing efficient diagnostic markers. The aim of this study was to identify the antigenic and immunodominant immunogenic proteins of *Toxoplasma gondii* in sheep using immunoproteomic techniques.Thirty C57BL/6 mice (male, 5-7 weekly) were selected for providing *Toxoplasma gondii* tachyzoites. Proteins of tachyzoites were collected using sonication method and the concentration of the proteins was determined by Bradford method. On the other hand, ovine serum containing anti-*Toxoplasma gondii* antibodies was collected from 10 infected sheep. Then 2-DE-SDS-PAGE electrophoresis, western blotting and immune blotting techniques were carried out. Finally, it was specified and distinguished the spots which belonged to immunogenic and antigenic proteins on the gels, and the proteins were identified by mass spectrometry (MS/MS, MALDI-TOF/MS). The identified two proteins were enolase 2 and rhoptry protein 4 (ROP4).These immunodominant immunogenic and antigenic proteins have potential of being used as markers in serological diagnostic techniques and they may candidate vaccine against *Toxoplasma gondii* infection.

Key words: *Toxoplasma gondii*, Rhoptry protein4, Enolase2, Immunodominant Antigens, Immunoproteomics, Sheep

مقدمه

توکسوپلاسما گوندی *(Toxoplasma gondii)*، تک‌یاخته متعلق به شاخه‌اپی کمپلکسا، رده اسپوروزوآ و خانواده سارکوسیستیده، انگل درون سلولی اجباری هتروگزنوز است که مخزن و میزبان اصلی آن گربه‌سانان هستند ولی بسیاری از مهره‌داران خونگرم از جمله جوندگان، انسان و دام‌ها می‌توانند به عنوان میزبانان واسط در سیر تکاملی این تک‌یاخته نقش ایفا کنند. توکسوپلاسموزیس به عنوان عفونت حاصله از این تک‌یاخته، در بسیاری از میزبانان یا بدون نشانگان بالینی است و یا عوارض و پیامدهای شدیدی ندارد. ولی در برخی از میزبان‌ها بخصوص انسان و گوسفند در دوران آبستنی می‌تواند منجر به مرگ و سقط جنین شود. همچنین در انسان، در مبتلایان دچار نقص ایمنی منجر به آنسفالیت و مرگ و میر می‌گردد. لذا ردیابی عفونت و کنترل و تشخیص زودهنگام بیماری در این قبیل میزبانان بویژه در خانم‌های باردار و همچنین میش‌های آبستن، امری کاملا ضروری است. ازطرف دیگر، تلاش برای تولید واکسن‌های موثر جهت استفاده در انسان و گوسفند قبل از آبستنی برای پیشگیری از بروز توکسوپلاسموز مادرزادی و جلوگیری از خطر سقط جنین، حائز اهمیت می‌باشد.

در تمام دنیا، آنتی‌بادی‌های توکسوپلاسما گوندی در سرم خون گوسفندان یافت می‌شود و فراوانی آنتی‌بادی‌ها در میش‌ها بمراتب بیشتر از دو برابر بره‌ها است. فراوانی سرولوژیکی آنتی‌بادی‌های ضد توکسوپلاسما گوندی در گوسفندان از سه در صد تا ۹۳ درصد در سراسر جهان می‌باشد (۲۲). در مکزیک (۲۰۱۳) عفونت توکسوپلاسما گوندی درگوسفند ۲۹/۹ درصد، در تونس (۲۰۱۷) ۳۳/۳ درصد (میش‌ها) و ۳۲/۵ درصد (بزها)، در کانادا (۱۹۹۱) ۶/ ۵۷ درصد، در فرانسه (۲۰۰۶) ۵۶/۶ درصد در میش‌ها و ۲۲ درصد در بره‌ها و در اسپانیا ۳۴/۹ درصد در جنین‌های سقط شده گوسفندی تعیین گردید (۲۱، ۹، ۶، ۲).همچنین در نواحی جنوبی منطقه توسکانی ایتالیا (۲۰۱۳) مطالعات نشان داد که حداقل یکی از حیوانات بازای هر گله در ۳۲ گله از ۳۳ گله سرم مثبت بودند (۶). بر اساس برخی مطالعات انجام شده در ایران، شیوع عفونت توکسوپلاسما گوندی گوسفندان در اصفهان (۱۳۹۶) ۲۲/۸۱ درصد، در

تبریز (۲۰۱۱) ۵۶/۸ درصد و در کرمان (۲۰۰۸) ۱۵/۸ درصد در بزها و ۲۴/۷ درصد در گوسفندان می‌باشد (۱۷، ۱۵، ۴).

در سال ۱۹۸۳ واکسنی توسط ویلکینز و اوکونل و در سال ۱۹۹۵ واکسن مشابهی توسط بوکستون و اینس، به منظور کاهش آسیب‌های جنینی توکسوپلاسموز در گوسفندان تولید و تجاری سازی (Toxo vax) شد (۵،۹). در سال‌های اخیر، تولید آزمایشی(تجربی) واکسن‌هایی با ترکیبات گوناگون آنتی‌ژنی، پروتئینی از جمله واکسن‌های آنتی‌ژنی +SAG۱ +SAG۲ +GRA۴، +ROP۲ +ROP۴ +SAG۱ و +ROP۲ +ROP۴ +GRA۴ با موفقیت‌هایی روبرو بوده است (۶،۱۹).

شناسایی پروتئین‌های آنتی‌ژنیک و ایمونوژنیک انگل توکسوپلاسما گوندی کمک زیادی به بهبود تکنیک‌های تشخیصی و افزایش دقت و اعتبار روش‌های سرولوژیکی نموده است. در واقع از پروتئین‌های ایمونوژنیک و آنتی‌ژنیک غالب ایمنی می‌توان به عنوان مارکرهای تشخیصی در تکنیک‌های سرولوژیکی استفاده کرد، همچنین این پروتئین‌ها را می‌توان در ساخت قوی‌ترین و موثرترین واکسن‌ها جهت ایمن‌سازی و مصون کردن میزبان‌های حساس در معرض خطر مورد استفاده قرار داد. اخیرا بدنبال یک مطالعه، واکسن‌های DNAی رمز کننده آنتی‌ژن‌های GRA۱ و MIC۳ توسعه داده شدند (۱۳). در مطالعه دیگر، ژنگ و همکاران (۲۰۱۳) در مورد پروتئین راپتری ۵ (ROP۵) بررسی‌هایی را انجام دادند و نتیجه گرفتند که واکسیناسیون با ترکیب rROP۵+ rSAG۱ می‌تواند محافظت موثرتری در مقابل توکسوپلاسما گوندیی ایجاد کند. این پژوهشگران، آنتی‌ژن نوترکیب ROP۵ را به عنوان نامزد مناسب برای ساخت واکسن علیه توکسوپلاسموزیس معرفی کردند (۲۴). جیانگ و همکاران در سال ۲۰۱۶، در مطالعه خود اطلاعات مفید و جالبی در باره پروتئین ایمونوژن بنام انولاز ۲ بدست آوردند. این پژوهشگران با استفاده از روش های ایمونوپروتئومیکس (MALDI-TOF/MS) موفق به شناسایی انولاز ۲ شدند (۱۶).

هدف از انجام این مطالعه شناسایی و تعیین ماهیت و معرفی پروتئین‌های آنتی‌ژنیک و ایمونوژنیک توکسوپلاسما گوندی در گوسفند بود. به منظور شناسایی این پروتئین‌ها از روش‌های ایمونوپروتئومیکس شامل الکتروفورز دوبعدی و ایمونوبلاتینگ و آنالیز مس اسپکترومتری استفاده شد.

مواد و روش‌ها

تهیه تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندی

تعداد ۳۰ سر موش سوری (C57BL/6) ماده بالغ (۷-۵ هفته) به وزن ۳۰-۲۵ گرم، با تزریق داخل صفاقی انگل توکسوپلاسما گوندی سویه RH آلوده گردیدند. بعد از گذشت ۷۲ ساعت اقدام به کشتن موش‌ها با روش قطع نخاعی و جمع‌آوری مایع صفاقی حاوی تاکی زوئیت‌ها شد. مایع صفاقی جمع‌آوری شده ۴ بار سانتریفوژ (۴۰۰۰ دور بمدت ۴ دقیقه) و شستشو گردید. به منظور سلول گیری و تخلیص، مقدار ۲۰ mg آنزیم پپسین به ۲۰ ml محلول تاکی زوئیت‌ها اضافه شد و پس از ۲۰ دقیقه مجددا سانتریفوژ (۴۰۰۰ دور بمدت ۱۰ دقیقه) و شستن محلول در سه نوبت انجام شد. برای اطمینان از حضور تعداد کافی تاکی زوئیت در محلول، اقدام به تهیه اسمیر انگل و مشاهده میکروسکوپی و شمارش تاکی زوئیت‌ها به روش نئوبار گردید.

استخراج پروتئین‌های تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندی آزمایشگاهی

به منظور استخراج و تهیه پروتئین‌های تاکی زوئیت‌ها از روش سونیکاسیون استفاده شد. نخست جهت غیرفعال کردن پروتئازها از ماده فنیل متان سولفونیل فلوراید (PMSF) به میزان ۲۵ µl به ازای ۵ ml محلول تاکی زوئیت اضافه گردید. سپس در سونیکاتور (Hielsche, Asset Number RF۱۰) طبق برنامه ۰/۵ ثانیه پالس، ۰/۵ ثانیه استراحت/ فرکانس ۱۲۰ Hz / بمدت ۵ دقیقه اقدام به خرد کردن و شکستن تاکی زوئیت‌ها و آزاد کردن پروتئین‌ها شد. بعد از سونیکاسیون، محلول حاوی پروتئین‌های تاکی زوئیت‌ها با میکروسانتریفوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بمدت ۱۰ دقیقه مورد سانتریفوژ قرار گرفت. سپس به منظور اطمینان از شکستن تاکی زوئیت‌ها و آزاد شدن پروتئین‌ها، اقدام به تهیه اسمیر و مشاهده میکروسکوپی شد. مایع رویی به میکروتیوب‌ها منتقل و تا زمان مصرف و شروع مراحل بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

تعیین غلظت پروتئین‌های تاکی زوئیت‌ها و تغلیظ پروتئین‌ها

غلظت پروتئین‌ها به روش بردفورد (Bradford) با دستگاه بیوفتومتر (Eppendorff) در Adsorbance معادل ۰/۶۷۵ A° قرائت و اندازه‌گیری شد. سپس جهت افزایش غلظت پروتئین‌ها، محلول پروتئین‌های تاکی زوئیت‌ها در دستگاه تغلیظ (Concentrator) بمدت یک ساعت قرار داده شد و غلظت پروتئین‌ها مجددا اندازه‌گیری شد.

تهیه سرم‌های گوسفندی حاوی آنتی‌بادی‌های ضد توکسوپلاسما گوندی

با توجه به اینکه برای انجام ایمونوبلاتینگ و شناسایی پروتئین‌های غالب ایمنی توکسوپلاسما گوندی، سرم گوسفندی حاوی آنتی‌بادی‌های ضد توکسوپلاسما گوندی مورد نیاز بود لذا تعداد ۱۰ نمونه سرم گوسفندی مثبت از نظر آنتی‌بادی‌های ضد توکسوپلاسما گوندی با استفاده از روش سرولوژیکی IFA شناسایی و تهیه گردید.

انجام الکتروفورز دوبعدی

براساس پروتکل الکتروفورز دوبعدی (۸)، مراحل الکتروفورز بشرح زیر اجرا شد:

جمع‌آوری سلول‌ها و شستشو، شمارش سلولی، لیز و تخریب سلول‌ها، تعیین غلظت، بکارگیری نمونه و انجام رهیدراسیون، اجرای مرحله الکترو فوکوسینگ (IEF)، SDS-PAGE موازنه‌سازی (Equilibration IPG)، رنگ‌آمیزی آبی کوماسی.

همچنین تمامی محلول‌ها و معرف‌های مورد نیاز برای الکتروفورز، از جمله معرف‌های رهیدراسیون (شامل محلول استوک بروموفنل آبی، محلول استوک بافر رهیدراسیون و بافر رهیدراسیون)، معرف‌های سه گانه متعادل‌سازی، محلول استوک منومر، محلول بافر ژل، محلول SDS ۱۰ درصد، محلول آمونیوم پرسولفات (APS ۱۰ درصد)، محلول نگهداری ژل، محلول بافر running (۱۰ درصد) و محلول بافر- اشباع- آب تهیه شدند.

رنگ‌آمیزی آبی کوماسی

به منظور آشکارسازی پروتئین‌ها بر روی ژل دوبعدی، رنگ‌آمیزی به روش آبی کوماسی مطابق پروتکل (۲۰) بشرح زیر انجام شد: ۱- غوطه‌ور کردن ژل در اتانول ۵۰ درصد و اسیداستیک ۱۰ درصد بمدت یک ساعت، ۲- خیساندن ژل در اتانول ۵ درصد و اسیداستیک ۵ درصد بطور شبانه، ۳- شستشو در آب مقطر دوبار تقطیر بمدت یک ساعت، ۴- اضافه کردن محلول رنگ آبی بر روی ژل حداقل بمدت سه ساعت، ۵- شستن ژل در آب دو بار تقطیر بمدت ۱۵ دقیقه و ۶- غوطه ور سازی مجدد ژل در آب دو بار تقطیر بمدت یک ساعت.

وسترن بلاتینگ و ایمونوبلاتینگ

آماده‌سازی ژل و کاغذ PVDF مطابق دستورالعمل وسترن بلاتینگ (۸) انجام شد. بعد از انکوبه کردن کاغذ PVDF در متانول بمدت ۳۰ دقیقه، این کاغذ بمدت پنج دقیقه در بافر ترانسفر قرار داده شد. ژل نیز پنج دقیقه در بافر ترانسفر انکوبه گردید. ولتاژ اعمال شده در طول ترانسفر ۵۰ ولت بمدت سه ساعت و ۴۰ دقیقه بود. بعد از اتمام، ژل داخل رنگ آمیزی کاغذ PVDF ترانسفر شده، رنگ Ponceaus را روی کاغذ ریخته و زمان داده شد تا اسپات ها نمایان شوند و سپس جهت رنگ زدایی، کاغذ مورد شستشو قرار گرفت. کاغذ PVDF داخل ظرف پلاستیکی قرار داده شد و روی آن محلول بلاکینگ اضافه شد و بمدت ۲۴ ساعت در دمای یخچال نگه‌داری گردید.

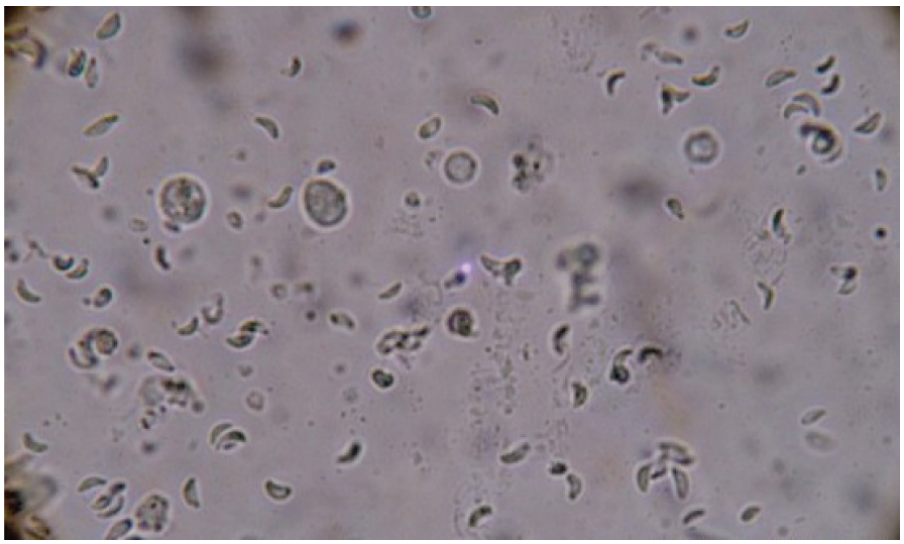
جهت ایمونوبلاتینگ، محلول مسدود کننده (بلاکینگ) دور ریخته شد و کاغذ PVDF با محلول TTBS بمدت ۱۰ دقیقه شستشو گردید. سپس اقدام به آماده‌سازی آنتی‌بادی اولیه (۲/۵ µl سرم گوسفندی مثبت از نظر توکسوپلاسما گوندیی+ ۵ ml بافر بلاکینگ) شد. آنتی‌بادی اولیه تهیه شده بمدت دو ساعت در دمای اتاق روی شیکر انکوبه و کاغذ سه بار بمدت پنج دقیقه با محلول TTBS شستشو گردید. در مرحله بعدی، آنتی‌بادی ثانویه (۱ µl آنتی‌بادی ثانویه+ ۱۰ ml بافر بلاکینگ) به کاغذ افزوده شد (آنتی‌بادی ثانویه Rabbit anti- Sheep IgG Antibody شرکت BETHYL USA). مدت زمان انکوباسیون با آنتی‌بادی ثانویه یک ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر دورانی بود. کاغذ سه بار با محلول TTBS (بمدت ۱۰ دقیقه) و سپس یک بار با محلول TBS (بمدت ۵ دقیقه) شستشو داده شد.

برش اسپات

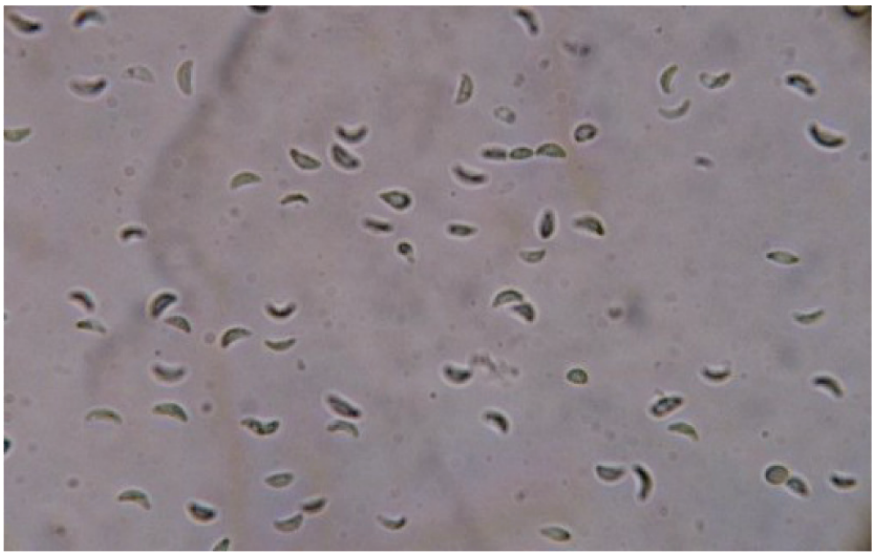
بعد از انطباق دادن اسپات‌های تشکیل شده در ژل‌های مربوط به پروتئین‌های تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندی و همچنین آنتی‌بادی‌های آنتی توکسوپلاسما گوندی سرم گوسفندی، اسپات‌های پروتئینی (پروتئین‌های آنتی ژنیک و ایمونوژنیک غالب ایمنی) تعیین و انتخاب شدند. این اسپات‌ها در اتاق استریل و در زیر هود از ژل برش داده شد و در داخل میکروتیوب‌های استریل قرار داده شد. و از طریق شرکت سینا کلون جهت انجام مس اسپکترومتری به آزمایشگاه پروتئومیکس ارسال شد.

مس اسپکترومتری

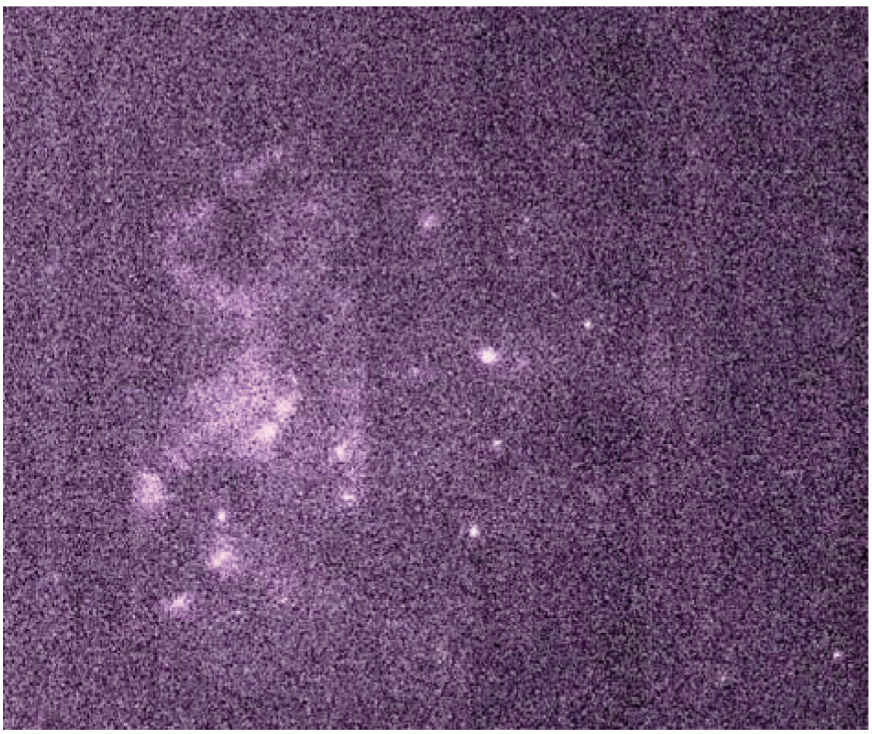
در آزمایشگاه پروتئومیکس دانشگاه York انگلستان، مراحل هضم پروتئین (با آنزیم تریپسین) و جداسازی پپتیدها (با روش‌های HPLC



شکل ۱- تاکی زوئیت های توکسوپلاسما گوندی قبل از تخلیص



شکل ۲- تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندی بعد از تخلیص



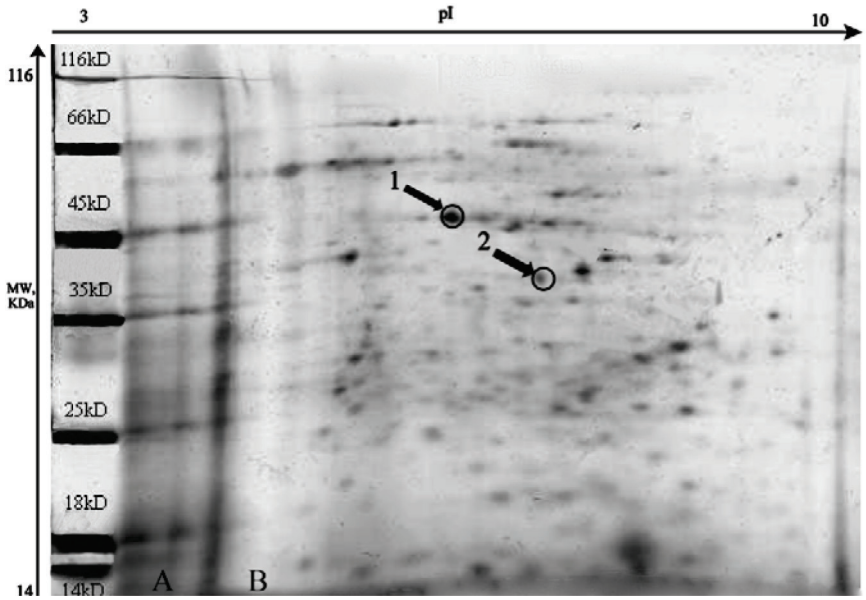
شکل ۳- وسترن بلاتینگ سرم گوسفندی

و Ion exchange) و یونیزاسیون پروتئین (الکترواسپری و MALDI) انجام شد و دو پروتئین مورد نظر با استفاده از روش‌های MS/MS و MALDI-TOF/MS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و اطلاعات مربوط به پروتئین‌های هدف با استفاده از سایت‌های تخصصی matrix، ncbi و uniprot تکمیل گردید.

نتایج

تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندی با کیفیت مناسب از مایع صفاقی موش‌ها تهیه و سپس تخلیص گردید (شکل‌های ۱ و ۲). با استفاده از روش نئوبار، غلظت تاکی زوئیت‌ها برابر $N= ۵,۱۵\times ۱۰^{۸}$ تعیین شد. بعد از انجام سونیکاسیون، غلظت پروتئین‌های تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندی به روش بردفورد برابر ۱,۴۷ mg/ml محاسبه گردید. بعد از تغلیظ پروتئین‌ها در دستگاه تغلیظ‌کننده (Concentrator) غلظت پروتئین‌ها ۲,۲۴۶ mg/ml تعیین شد.

با انجام الکتروفورز دو بعدی (DE-SDS-PAGE-۲)، پروتئین‌های زیادی در ژل بصورت اسپات‌های جداگانه پراکنده شدند. از طرف دیگر،



شکل ۴- اسپات‌های مربوط به دو پروتئین آنتی ژنیک و ایموژنیک توکسوپلاسما گوندی در ژل 2-DE

جدول ۱- برخی مشخصات دو پروتئین آنتی ژنیک و ایمونوژنیک توکسوپلاسما گوندی شناسایی شده در پروب سرم گوسفندی

Spot No.	Protein name	NCBI ID	PI	MW	Protein score	Protein Score C.I.(٪)a	Sequence Coverage (٪)b	No. of Matched peptides	Serum samples
۱	Enolase ۲	۶۷۲۵۶۵۹۹۸|gi	۵,۶۷	۴۸۸۸۷	۱۵۹	۱۰۰	۸۲,۶	۲۰	Sheep
۲	ROP۴	۶۶۸۹۳۴۱|gi	۶,۲۸	۴۲۶۴۹	۱۴۴	۱۰۰	۷۹,۲	۲۲	Sheep
a C.I.٪ = the confidence interval for the Protein score.									
b (Number of the matched residues/total number of residues in the entire sequence)×٪۱۰۰									

بدنبال انجام ایمونوبلاتینگ سرم خون گوسفندی حاوی آنتی‌بادی‌های آنتی توکسوپلاسما گوندیی(شکل ۳)، اسپات‌های متعددی بر روی ژل تشکیل شد و از انطباق تصاویر ژل DE-۲ و ژل ایمونوبلاتینگ برروی هم، دو پروتئین آنتی‌ژنیک و ایمونوژنیک غالب ایمنی شناسایی گردید (شکل ۴). با انجام مس اسپکترومتری و آنالیز mascot و مراجعه به سایت‌های ncbi و uniprot ماهیت دو پروتئین هدف بصورت پروتئین انولاز۲ و پروتئین راپتری ۴ (ROP۴) مشخص گردید (جدول ۱).

بحث

در این مطالعه، پروتئین‌های ایمونوراکتیو و آنتی‌ژنیک تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندیی با بکارگیری الکتروفورز دوبعدی، ایمونوبلاتینگ و آنالیز مس اسپکترومتری در سرم‌های گوسفندی مثبت از نظر آنتی‌بادی ضد توکسوپلاسما گوندیی مورد بررسی قرار گرفت. جهت تهیه تاکی زوئیت‌ها تعداد ۳۰ سر موش سوری (۶/C۵۷BL) ماده بالغ ۷-۵ هفته مورد استفاده قرار گرفت. تاکی زوئیت‌ها با غلظت $۵/۱۵ \times ۱۰^{۸}$ عدد در هر ml محلول تهیه شد. بعد از انجام سونیکاسیون، پروتئین‌های تاکی زوئیت‌ها با روش بردفورد تعیین غلظت شد (۱/۱۴۷ mg/ml) و بعد از تغلیظ، غلظت پروتئین‌ها به ۲/۲۴۶ mg/ml افزایش پیدا کرد. از ۱۰ راس گوسفند آلوده به توکسوپلاسما گوندیی، سرم خون تهیه گردید. بعد از انجام الکتروفورز دو بعدی (DE-SDS-PAGE-۲)، وسترن بلاتینگ و ایمونوبلاتینگ و انطباق تصاویر ژل‌های بدست آمده، دو اسپات مربوط به دو پروتئین آنتی‌ژنیک و ایمونوژنیک غالب ایمنی انتخاب شد. آنالیز مس اسپکترومتری MALDI-TOF/MS و MS/MS منجر به شناسایی این دو پروتئین به اسامی انولاز ۲ (enolase ۲) و پروتئین راپتری ۴ (ROP۴) گردید.

انولاز۲، یک پروتئین با محافظت بالایی است که در بسیاری از جانداران از جمله انگل‌ها یافت می‌شود. یک ویژگی این پروتئین، خواص کاتالیتیکی و بخصوص خاصیت گلیکولیتیکی آن است که باعث تبدیل ۲-فسفو- D- گلیسرات (۲PGA) به فسفو انول پیرووات در طول گلیکولیز و گلیکونئوژنز می‌شود، این دو در مسیر متابولیکی اغلب برای نقش سلولی حیاتی و مهم هستند (۱۴). روآ و همکاران در مقاله تحقیقی خود بیان می‌کنند که دو شکل گلیکولیتیک انولاز در ژنوم توکسوپلاسما گوندیی رمزگذاری شده‌اند. بیان اختصاصی ژن‌های انولاز به تغییر مرحله زندگی انگل بستگی دارد. انولاز ۱ که منحصرا در برادی زوئیت‌های با رشد آهسته بیان می‌شود و انولاز ۲ فقط در تاکی زوئیت‌های با رشد سریع بروز پیدا می‌کند (۲۳).

جیانگ و همکاران (۲۰۱۶) موفق به شناسایی پروتئین ایمونوژن انولاز ۲ در بین آنتی‌ژن‌های توکسوپلاسما گوندیی شدند. روش مورد استفاده در این مطالعه، ایمونوپروتئومیکس برپایه مس اسپکترومتری بود. این پژوهشگران اقدام به آنالیز BLAST نمودند که تشابه ۹۶-۷۵ درصدی انولاز۲ مربوط به سایر انگل‌ها را تایید کرد. نتایج این مطالعه، فعالیت ایمنی (ایمونوژن) مناسب انولاز ۲ را در برابر سرم حیوان آلوده به توکسوپلاسما گوندیی نشان داد. این پژوهشگران، پروتئین انولاز ۲ توکسوپلاسما گوندیی را به عنوان هدف دارویی جدید و نامزدی برای تولید واکسن برعلیه عفونت توکسوپلاسموزیس پیشنهاد نمودند (۱۶).

در مطالعه ما یکی از پروتئین‌های مهمی که مورد شناسایی قرار گرفت پروتئین انولاز ۲ می‌باشد و روش مورد استفاده در مطالعه حاضر، مشابه روش بکار رفته در مطالعه جیانگ و همکاران است.

انولاز ۲ پروتئینی با ۴۷۵ اسید آمینه، دارای پنج جایگاه اتصالی در موقعیت‌های اسیدهای آمینه شماره ۱۹۶، ۲۰۵، ۳۳۴، ۳۶۱ و ۴۳۷ و همچنین دارای دو جایگاه فعال می‌باشد که جایگاه فعال اول در موقعیت اسید آمینه ۲۴۸ قرار دارد و نقش‌دهنده پروتون را ایفا می‌کند، درحالی که جایگاه فعال دوم در موقعیت اسید آمینه ۳۸۶ قرار دارد و به عنوان پذیرنده پروتون عمل می‌نماید (۱).

پروتئین راپتری ۴ (ROP۴) یکی از پروتئین‌های مهم ترشحی تاکی زوئیت توکسوپلاسما گوندیی است که نقش مهمی در عفونت توکسوپلاسموز دارد. این پروتئین در تکمیل ساختار غشای واکوئل پارازیتوفوروس (PV) شرکت می‌کند بنابراین در نفوذ انگل به سلول میزبان و در تهاجم نقش ایفا می‌کند (۱۱،۱۸). دزیادک و همکاران (۲۰۱۲)، در راستای تولید واکسن موثر در مقابل عفونت توکسوپلاسما گوندیی، تاثیر ایمن‌زایی سه نوترکیب آنتی‌ژنی تری والان شامل rROP۴ +rROP۲ +rSAG۱ ,rROP۲ +rGRA۴ +rSAG۱ و rROP۲ +rROP۴ +rGRA۴ را در موش‌های آلوده به توکسوپلاسموز مزمن مورد آزمایش قرار دادند. نتایج نشان داد که ترکیبات rROP۲ +rROP۴ +rGRA۴ و rROP۲ +rROP۴ +rSAG۱ در تکمیل و توسعه یک مصونیت بالا در موش‌های آزمایشگاهی بسیار موثر می‌باشند (۱۰). گاتکوسکا و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه خود سودمندی استفاده از آنتی‌ژن‌های نوترکیب راپتری توکسوپلاسما گوندیی شامل ROP۴ و ROP۲ در تشخیص مرحله عفونت توکسوپلاسموز در موش‌های آزمایشگاهی را با اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های IgM و IgG به وسیله تکنیک الایزا مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که پاسخ ایمنی موش‌ها نسبت به این آنتی‌ژن‌ها بطور مشخصی از نظر IgM بالاتر از IgG بود. در این مطالعه، قدرت تشخیصی پروتئین‌های ROP۴ و ROP۲ برای تشخیص مرحله تهاجم انگل در موش‌ها تایید شد و مشخص گردید که هر دوی این پروتئین‌ها می‌توانند پاسخ هومورال را تحریک و القا نمایند (۱۲). در مطالعه حاضر، پروتئین دیگری که به عنوان یک پروتئین آنتی‌ژنیک و ایمونوژن غالب ایمنی مورد شناسایی قرار گرفت پروتئین ROP۴ بود. این پروتئین دارای ۵۷۸ اسید آمینه، یک پپتید نشانه بطول ۳۳ اسید آمینه در بخش N-terminal و دارای یک دومن بطول ۲۸۸ اسید آمینه در موقعیت ۵۴۶-۲۵۹ می‌باشد که نقش پروتئین کینازی دارد (۱).

نتیجه‌گیری

دو پروتئین آنتی‌ژنیک و ایمونوزنیک غالب ایمنی شناسایی شده (انولاز ۲ و پروتئین راپتری ۴) در اثر بلاتینگ سرم گوسفندی حاوی آنتی‌بادی‌های ضد توکسوپلاسما گوندیی با پروتئین‌های تاکی زوئیت‌ها، قابلیت استفاده در تولید واکسن موثر علیه عفونت توکسوپلاسموز گوسفندی و همچنین بکارگیری به عنوان مارکرهای تشخیصی در آزمون‌های سرولوژیکی مانند الایزا برای تشخیص عفونت توکسوپلاسما گوندیی را دارند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت معاونت پژوهش و فناوری واحد علوم

و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی انجام شده است. از متخصصین و کارشناسان بخش انگل‌شناسی و آزمایشگاه پروتئومیکس انستیتو پاستور ایران بخاطر همکاری در اجرای این پروژه، صمیمانه تشکر می شود. این تحقیق هیچ تضاد منافعی با سایر افراد و موسسات ندارد.

منابع مورد استفاده

1. Ahady M.T. 2017. The study and identification of antigenic and immunodominant immunogenic proteins of *Toxoplasma gondii* in sheep and man using immunoproteomics procedure. PhD thesis. Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Alvarado-Esquivel C., D. Silva-Aguilar, I. Villena, and J.P. Dubey. 2013. Seroprevalence and correlates of *Toxoplasma gondii* infection in domestic sheep in Michoacan State, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine* 112:433-437.

3. Amdouni Y., M.R. Rjeibi, M. Rouatbi, S. Amairia, S. Awadi, and M. Gharbi. 2017. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* infection in slaughtered ruminants (sheep, goats and cattle) in Northwest Tunisia. *Meat Science* 133:180-184.

4. Bahrieni M., M. Fasihi Haradani, M. Beigzadeh, H. Kamyabi, and N. Zia-Ali. 2008. Risk Factors Analysis Associated with Seropositivity to *Toxoplasma gondii* in Sheep and Goats in Southeastern Iran Using Modified Agglutination Test (MAT). *Iranian Journal of Parasitology* 3 (1):38-43.

5. Buxton D. 1998. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, Neospora caninum and Sarcocystis spp.) in sheep and goats: recent advances. *Veterinary Research* 29 (3-4):289-310

6. Cenci-Goga B.T., A. Ciampelli, P. Sechi, F. Veronesi, I. Moretta, V. Cambiotti, et al. 2013. Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* in sheep in Grosseto district, Tuscany, Italy. *BMC Veterinary Research* 9:25.

7. Chuang S.C., J.C. Ko, C.P. Chen, J.T. Du, and C.D. Yang. 2013. Induction of long lasting protective immunity against *Toxoplasma gondii* in BALB/c mice by recombinant surface antigen 1 protein encapsulated in poly (lactide-co-glycolide) microparticles. *Parasites & Vectors* 6:34.

8. Coligan J.E., B.M. Dunn, D.W. Speicher, and P.T. Wingfield. 2003. Short protocols in protein science: a compendium of methods from protocols in protein science. John Wiley & Sons Inc., New York.

9. Dubey J.P. 2010. Toxoplasmosis of animals and humans, Second Edition. CRC Press, Taylor & Francis Group, Florida.

10. Dziadek B., J. Gatkowska, M. Grzybowski, J. Dziadek, K. Dziadek, and H. Dlugonska. 2012. *Toxoplasma gondii*: The vaccine potential of three trivalent antigen-cocktails composed of recombinant ROP2, ROP4, GRA4 and SAG1 proteins against chronic toxoplasmosis in BALB/c mice. *Experimental Parasitology* 131:133-138.

11. Fritz H.M., P.W. Bowyer, M. Bogyo, P.A. Conrad, and J.C. Boothroyd. 2012. Proteomic analysis of fractionated *Toxoplasma gondii* oocysts reveals clues to their environmental resistance. *PloS One* 7 (1):e29955.

12. Gatkowska J., B. Dziadek, A. Brzostek, D. Dziadek, K. Dzitko, and H. Dlugonska. 2010. Determination of Diagnostic Value of *Toxoplasma gondii* Recombination ROP2, ROP4 Antigens in Mouse Experimental Model. *Polish Journal of Microbiology* 59 (2):137-141.

13. Gong P., L. Cao, Y. Gue, H. Dong, S. Yuan, X. Yao, et al. 2016. *Toxoplasma gondii*: Protective immunity induced by a DNA vaccine expressing GRA1 and MIC3 against toxoplasmosis in BALB/c mice. *Experimental Parasitology* 166: 131-136.

14. Holmes M., U. Liwak, I. Pricop, X. Wang, S. Tomavo, S. Ananvoranich, et al. 2010. Silencing of tachyzoite enolase 2 alters nuclear targeting of bradyzoite enolase 1 in *Toxoplasma gondii*. *Microbes and Infection* 12:19-27.

15. Hoseininijad M., M. Shefaatifard, Y. Pirali, and H.R. Azizi. 2017. Sero-Prevalence of *Toxoplasma gondii* Infection in Sheep in Some Parts of Isfahan Province. *Veterinary Researches & Biological Products* 116:92-96.

16. Jiang W., J.X. Xue, Y.C. Liu, T. Li, X.G. Han, S.H. Wang, et al. 2016. Identification and characterization of an immunogenic antigen, enolase2, among excretory/secretory antigens (ESA) of *Toxoplasma gondii*. *Protein Expression and Purification* 127:88-97.

17. Khanmohammadi M. 2011. Seroprevalence Survey of *Toxoplasma gondii* Antibodies among Sheep in Tabriz District, Northwest Iran. *Annals of Biological Research* 2 (6): 484-488.

18. Lebrun M., V.B. Carruthers, and M.F. Cesbron-Delauw. 2014. *Toxoplasma gondii*, Second Edition, Chapter 12: Toxoplasma secretory proteins and their roles in cell Invasion and intracellular suvival. Elsevier: 389-453.

19. Lim S.S.Y., and R.Y. Othman. 2014. Recent Advances in *Toxoplasma gondii* Immunotherapeutics. *The Korean Journal of Parasitology* 52 (6): 581-593.

20. Ncuhoff V. 1985. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* 6:427-448.

21. Pereira-Bueno J., A. Quintanilla-Gozalo, V. Perez-Perez, G. Alvarez-Garcia, E. Collantes-Fernandez, and L.M. Ortega-Mora. 2004. Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. *Veterinary Parasitology* 121 (1-2):33-43.

22. Robert-Gangneux F., and M. Darde. 2012. Epidemiology of Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews* 25 (2):264-296.
23. Rua J., T. Mouveaux, S.H. Light, G. Minasov, W.F. Anderson, S. Tomavob, et al. 2015. The structure of bradyzoite-specific enolase from *Toxoplasma gondii* reveals insights into its dual cytoplasmic and nuclear functions. *Acta Crystallographica* 71:417-426.
24. Zheng B., S. Lu, Q. Tong, Q. Kong, and D. Lou. 2013. The virulence-related rhoptry protein 5 (ROP5) of *Toxoplasma gondii* is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis in mice. *Vaccine* 31:4578-4584.